

INDONESIAN JOURNAL OF

Clinical Pathology and Medical Laboratory

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 21	No. 2	Hal. 111-209	Surabaya Maret 2015	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	--------------	------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

Susunan Pengelola Jurnal Ilmiah Patologi Klinik Indonesia
(Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory)
Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia Masa Bakti 2013–2016
(surat keputusan pengurus pusat PDSPATKLIN Nomor 008/PP-PATKLIN/III/2014)

Pelindung:

Ketua Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Ketua:

Puspa Wardhani

Wakil Ketua:

Maimun Zulhaidah Arthamin

Sekretaris:

Dian Wahyu Utami

Bendahara:

Bastiana Bermawi

Anggota:

Osman D. Sianipar

Penelaah Ahli:

Riadi Wirawan, AAG. Sudewa, Rustadi Sosrosuhardjo, Rahayuningsih Dharma, Mansyur Arif

Penelaah Pelaksana:

Prihatini, July Kumalawati, Ida Parwati, Tahono, FM. Judajana, Krisnowati, Nurhayana Sennang Andi Nanggung, Aryati, Purwanto AP, Jusak Nugraha, Sidarti Soehita, Maimun Zulhaidah Arthamin, Endang Retnowati, Noormartany, Edi Widjajanto, Budi Mulyono, Adi Koesoema Aman, Uleng Bahrin, Ninik Sukartini, Kusworini Handono, JB. Soeparyatmo, M. Yolanda Probahoesodo, Rismawati Yaswir

Berlangganan:

3 kali terbit per tahun

Anggota dan anggota muda PDSPATKLIN mulai Tahun 2011 gratis setelah melunasi iuran

Bukan Anggota PDSPATKLIN: Rp 175.000,-/tahun

Uang dikirim ke alamat:

Bastiana Bermawi dr, SpPK

Bank Mandiri KCP SBY PDAM No AC: 142-00-1079020-1

Alamat Redaksi:

d/a Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Jl. Mayjend. Prof. Dr Moestopo 6–8 Surabaya.

Telp/Fax. (031) 5042113, 085-733220600 E-mail: majalah.ijcp@yahoo.com

Akreditasi No. 66/DIKTI/KEP/2011

INDONESIAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

<i>Pneumatic Tube terhadap Darah Rutin dan Laktat Dehidrogenase</i> (<i>Pneumatic Tube on Routine Blood Test and Lactate Dehydrogenase</i>) Liong Boy Kurniawan, Asvin Nurulita, Uleng Bahrun	111-114
Biakan Metode <i>Tetrazolium Microplate Assay</i> Terkait Dahak Pasien Terduga Tuberkulosis Paru (<i>Detection in Tetrazolium Microplate Assay Culture Methods from Pulmonary Tuberculosis Suspected Sputum</i>) Rita Rachmayanti, Ida Parwati, Tiene Rostini, Sylvia Rachmayati	115-119
Adiponektin <i>High Molecular Weight</i> dan Kekakuan Vaskular di Penyakit Diabetes Melitus Tipe-2 Terkait Gabungan <i>Glimepiride Metformin</i> Dosis Tetap (<i>High Molecular Weight Adiponectin and Vascular Thickness in Diabetes Type 2 related to Fixed Dose Combination of Glimepiride and Metformin</i>) Ari Sutjahjo	120-124
Angka Banding Neutrofil/Limfosit di Karsinoma Payudara (<i>Neutrophil/Lymphocyte Ratio in Carcinoma Mammæ</i>) Yuly Eko Prasetyo, Uleng Bahrun, Ruland DN. Pakasi	125-129
Agregasi Trombosit dan <i>Mean Platelet Volume</i> dengan Sindrom Metabolik Terkait Kegemukan (<i>Platelet Aggregation and Mean Volume With Metabolic Syndrome in Obesity</i>) Nindia Sugih Arto, Adi Koesoema Aman, Dharma Lindarto	130-134
Diagnosis Tuberkulosis Paru Menurut Kekerapan Pemeriksaan Dahak (<i>Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis Based on Frequency of Sputum Examination</i>) Larissa, Ida Parwati, A K Sugianli	135-137
Ragaman Genetik Gen Polimerase Virus Hepatitis B pada Pasien Hepatitis B Kronik dengan Pengobatan Telbivudin (<i>Genetic variation of Hepatitis B Virus Polymerase gene from chronic hepatitis B infected patient with telbivudine therapy</i>) Gondo Mastutik, Juniastuti, Ali Rohman, Mochamad Amin, Poernomo Boedi Setiawan	138-144
Protein Adhesin 38-kDa Mikobakterium Tuberkulosis dan Sel Makrofag Paru (<i>The 38 kDa Adhesin Protein of Mycobacterium tuberculosis and Macrophage of the Lung</i>) Maimun Zulhaidah A, Rahmawati, Bethasiwi Purbasari, Sumarno	145-152
Pola Bakteri dan Usia Pasien terhadap Prokalsitonin di Pneumonia Komunitas dan Nosokomial (<i>Bacterial Pattern and Patient's Age on Procalcitonin in Community and Hospital Acquired Pneumonia</i>) Coriejati, Mohammad Iqbal, Emmy Hermyanti Pranggono	153-157
<i>Aspergillus Glaucus Group</i> dan <i>Penicillium sp</i> di Ruang Operasi bedah Saraf (<i>Aspergillus Glaucus Group and Penicillium Sp in Neurosurgery Operating Theater</i>) Nurul Hasanah, Nurhayana Sennang, Benny Rusli	158-161

<p>Nilai Diagnostik IgA AntiVCA Antibodi Epstein-barr di Karsinoma Nasofaring <i>(Diagnostic Value of IgA antiVCA Epstein-Barr Antibody in Nasopharyngeal Carcinoma)</i> Betty Agustina Tambunan, Aryati, Windu Nafika.....</p>	162-169
<p>Uji Glukosa Darah antara Metode Heksokinase dengan Glukosa Oksidase dan Glukosa Dehidrogenase di Diabetes Melitus <i>(Blood Glucose Test Between Hexokinase With Glucose Oxidase and Glucose Dehydrogenase Methods in Diabetes mellitus)</i> Baharuddin, Asvin Nurulita, Mansyur Arif.....</p>	170-173
<p>B-thalassemia Trait Menggunakan Elektroforesis Mikrokapiler <i>(β-Thalassemia Trait Using Capillary Electrophoresis)</i> Nuryanti, Ratna Akbari Ganie, Adi Koesoema Aman.....</p>	174-178
<p>Lipoprotein(a) dan Kebahayaan Sindrom Koroner Akut <i>{Lipoprotein(a) in Acute Coronary Syndrome}</i> Ira Puspitawati, Setyawati, Dyah Wulan Anggrahini, Diah Saraswati, Aisyah Ratna Yuniarti</p>	179-182
<p>Kadar D-Dimer Plasma di Strok Iskemik Akut <i>(D-Dimer Plasma Levels in Ishemic Stroke)</i> Yessi Mayke, Adi Koesoema Aman, Y. Anwar.....</p>	183-186
<p>Adrenomedulin di Karsinoma Payudara dengan Metastasis <i>(Adrenomedullin's in Breast Cancer With Metastatic State)</i> Stefanus Lembar</p>	187-190
<p>Suhu Penyimpanan Kreatinin dan Asam Urat dalam Air Kemih Selama 24 Jam <i>(Storage Temperature For 24 Hours of Uric Acid in Urine)</i> AAN. Subawa, Sianny Herawati, I Nyoman Wande, I Wayan Putu Sutirta Yasa, Tjokorda Gede Oka</p>	191-195
TELAAH PUSTAKA	
<p>Penyakit Virus Ebola <i>(Ebola Virus Disease)</i> Henny Elfira Yanti, Aryati.....</p>	195-201
LAPORAN KASUS	
<p>Malaria Kongenital <i>(Congenital Malaria)</i> Sri Wahyunie S, Nurhayana Sennang, D. Daud, Mansyur Arif.....</p>	202-207
INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU	208-209

Ucapan terima kasih kepada penyunting Vol. 21 No. 2 Maret 2015

Sidarti Soehita, Jusak Nugraha, J.B. Soeparyatmo, Maimun Z. Arthamin,
Kusworini Handono, Rahayuningsih Dharma, July Kumalawati, Tahono, Rismawati Yaswir, Mansyur Arif

RAGAMAN GENETIK GEN POLIMERASE VIRUS HEPATITIS B PADA PASIEN HEPATITIS B KRONIK DENGAN PENGOBATAN TELBIVUDIN

(Genetic variation of Hepatitis B Virus Polymerase gene from chronic hepatitis B infected patient with telbivudine therapy)

Gondo Mastutik¹, Junlastuti², Ali Rohman³, Mochamad Amin⁴, Poernomo Boedi Setiawan⁵

ABSTRACT

Infection caused by hepatitis B virus (HBV) is still a major global health problem and can cause liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma as well. Telbivudine is one among the drugs used to treat the disease routinely. However, using this drug in a long term therapy might cause mutations in HBV polymerase gene that decreases the effectiveness of the therapy. Here with the researchers report the genetic variations of the gene isolated from telbivudine-which is used treated chronic hepatitis B patients in Surabaya, Indonesia. The blood sera were collected at Dr. Soetomo hospital from 10 telbivudine-treated and 10 untreated chronic hepatitis B patients. The DNA viral was isolated and purified from each serum. Sequence polymerase gene at nucleotides 455 to 796 was amplified by PCR, and then analyzed bio informatically to determine their mutation profile. This study revealed a point mutation in HBV25 sample at nucleotide A1525G that gives rise to I509V modification. Such mutation is also observed in a sequence that is available in Gen Bank with an accession number AY641562. Additionally, the researchers found point mutations A1554G, T1593C, and C1629T in HBV25 sample and a point mutation A1554G in HBV20 sample. However, these mutations are silent. To conclude, the mutation in HBV polymerase gene among telbivudine-treated chronic hepatitis B patients in Surabaya is known as A1525G.

Key word: Chronic hepatitis B infection, telbivudine, polymerase gene

ABSTRAK

Infeksi virus hepatitis B (VHB) masih merupakan salah satu masalah kesehatan utama dunia dan menyebabkan sirosis maupun karsinoma hepatoseluler. Telbivudin adalah salah satu obat yang sering dipakai untuk mengobati hepatitis B secara rutin. Walaupun demikian, penggunaan obat tersebut dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan perpindahan gen polimerase VHB, sehingga mengurangi ketepatan-gunaan pengobatan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ragam gen polimerase VHB dari pasien hepatitis B kronis yang mendapat pengobatan telbivudin di Surabaya, Indonesia dengan menganalisisnya. Sampel serum darah dikumpulkan di rumah sakit Dr. Soetomo dari 10 orang pasien yang mendapat pengobatan telbivudin dan 10 orang yang tanpa pengobatan. DNA virus diisolasi dan dimurnikan dari serum. Sekuens gen polimerase nukleotida 455 sampai 796 diperbanyak dengan metode PCR, kemudian dianalisis untuk menunjukkan profil ragam perpindahan. Hasil meneliti ini menunjukkan perpindahan titik A1525G di sampel HBV25 yang menyebabkan perubahan asam amino I509V. Perpindahan seperti ini juga terjadi sekuens di Gen Bank nomor jangkauan AY641562. Di samping itu, perpindahan titik juga ditemukan pada sampel HBV25 yaitu 1554G, T1593C dan C1629T serta A1554G di sampel HBV20. Walaupun demikian, perpindahan tersebut tidak menyebabkan perubahan asam amino di gen polimerase VHB. Berdasarkan kajian ini, dapat disimpulkan, bahwa perpindahan gen polimerase VHB dari pasien hepatitis B kronis yang mendapat pengobatan telbivudin di Surabaya terjadi di A1525G.

Kata kunci: Infeksi hepatitis B kronik, telbivudin, gen polimerase

PENDAHULUAN

Infeksi virus hepatitis B (VHB) masih menjadi masalah kesehatan mendunia, dengan tingkat jumlah penyakit tertentu yang amat tinggi mendekati antara 10–15% populasi Asia di seluruh dunia dan di penduduk pindahan Asia di Amerika Serikat.¹

Komplikasi infeksi kronis yaitu sirosis hati dan karsinoma hepatoseluler.^{1,2} Meskipun sebagian besar pembawa (*carrier*) VHB tidak berkembang ke komplikasi. Namun, antara 15–40% dari orang yang terinfeksi berkembang komplikasi infeksi kronis.^{1,3}

Beberapa strategi terdapat untuk mencegah komplikasi tersebut, yaitu pencegahan dengan

¹ Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. E-mail: gondomastutik@gmail.com

² Departemen Mikrobiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

³ Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

⁴ Laboratorium Hepatitis Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga

⁵ Departemen Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

vaksinasi yang cukup tepat guna untuk menurunkan kejadian karsinoma hepatoseluler bagi anak dan pengobatan dengan antivirus untuk mengendalikan replikasi VHB dan mencegah kerusakan hati. Pengobatan dengan antivirus ini cukup tepat guna untuk menurunkan jumlah *deoxyribonucleic acid* (DNA) VHB dalam serum.⁴ Tujuan utama pengobatan antivirus adalah untuk mencegah perkembangan komplikasi hati karena sirosis atau karsinoma hepatoseluler dengan cara menekan replikasi virus. Pengobatan antivirus di pasien yang terinfeksi VHB yang masih wild type bertujuan untuk mencapai serokonversi antigen e Hepatitis B (HBeAg) menjadi antiHBe. HBeAg adalah petunjuk yang menunjukkan virus sedang bereplikasi dan antiHBe adalah antibodi terhadap HBeAg. Serokonversi ini dapat dicapai jika terjadi penurunan *viral load* yang kemudian disertai dengan serokonversi HBsAg ke antiHBs (serokonversi HBs).⁵

Berbagai macam obat yang telah digunakan untuk pengobatan infeksi VHB yaitu; *interferon alfa-2b*, *lamivudin*, *adefovir*, *entecavir*, *pegylated interferon alfa-2a* dan *telbivudin*. Nukleosida yang sejalan tersebut bertindak sebagai penghalang khusus untuk *polymerase/reverse transcriptase* virus guna menghambat fungsi polimerase VHB. Hal yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan obat untuk pengobatan, yaitu lamanya dan bahaya terhadap perkembangan resistansi virus. Pengobatan dengan nukleosida sejalan dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan VHB mutan dengan perpindahan di gen polimerase.^{1,6}

Telbivudin (β -l-2'-*deoxythymidine*) merupakan jenis L-nukelosida yang sejalan secara struktural mirip dengan *lamivudin*. Obat ini beraktivitas anti VHB yang berpeluang kuat dan khas serta telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika untuk pengobatan infeksi hepatitis B kronik.^{7,8} Uji preklinik menunjukkan bahwa *telbivudin* tidak berpengaruh mutagenik atau karsinogenik dan tidak berdampak toksik di janin. Uji klinik tahap awal menunjukkan bahwa pengobatan dengan *telbivudin* dapat menurunkan jumlah DNA VHB dalam serum lebih besar dibandingkan dengan *lamivudin* dan resistansi terhadap *telbivudin* lebih jarang dibandingkan dengan *lamivudin*.⁸ Hasil meneliti GLOBE dalam uji tahap ketiga (III) *telbivudin* menunjukkan bahwa setelah 52 minggu pengobatan *telbivudin* dapat menurunkan DNA VHB dalam serum sehingga DNA VHB menjadi tidak terdeteksi pada 60% sampel *telbivudin* dan 40% sampel *lamivudin*. Demikian juga kadar ALT darah mencapai nilai normal pada 77% dan *telbivudin* serta 75% *lamivudin*. Dan terjadi serokonversi HBeAg (pembentukan antibodi terhadap HBeAg, yaitu

antiHBe) pada 22% yang diobati *telbivudin* serta 21% pada pengobatan *lamivudin*.⁷

Pengobatan dengan *telbivudin* pada awalnya dapat menurunkan *viral load*, tetapi dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan resistansi virus akibat perpindahan di gen polimerase VHB. Data menunjukkan bahwa pengobatan *telbivudin* selama satu tahun dapat menyebabkan resistansi virus sebanyak 2,7–4,4% dan selama 2 tahun sebanyak 8,6–21,6%.¹ Kejadian resistansi virus ini terkait dengan perpindahan gen polimerase VHB. Berdasarkan hal tersebut perlu diteliti untuk menganalisis gen polimerase VHB di serum pasien hepatitis B kronik setelah mendapat pengobatan *telbivudin*. Hasil meneliti ini diharapkan dapat digunakan untuk mengetahui ragam gen polimerase VHB di pasien hepatitis B kronik yang mendapat pengobatan antivirus *telbivudin*.

METODE

Penelitian ini merupakan kajian eksplorasi laboratoris yang bertujuan untuk mengetahui ragam genetik gen polimerase VHB pada pasien infeksi VHB yang mendapat pengobatan *telbivudin* dengan menganalisisnya. Penelitian ini dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga. Sampel penelitian berupa 20 serum yang diperoleh dari pasien infeksi VHB yang mendapat dan tidak mendapat pengobatan anti virus di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr Soetomo Surabaya. Sampel kelompok pembandingan yaitu 10 serum diperoleh dari pasien infeksi VHB yang ditandai dengan HBsAg positif dan tidak mendapat pengobatan anti virus. Sampel untuk kelompok perlakuan yaitu 10 serum diperoleh dari pasien infeksi VHB yang ditandai dengan HBsAg positif dan memenuhi patokan syarat mendapat pengobatan anti virus, yaitu DNA HBV dalam serum lebih dari 100.000 kopi/mL (20.000 IU/mL) dan mendapat pengobatan *telbivudin* selama satu (1) tahun.

Penyarian DNA dilakukan dari serum dengan menggunakan perangkat *NucleoSpin@Blood* (*Macherey-Nagel*) dan disesuaikan dengan catatan laporan pemurnian DNA perangkat tersebut. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan perangkat *PCR Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (*Invitrogen*). Primer yang digunakan seperti penelitian sebelumnya yaitu P7 dan P8 untuk putaran pertama, kemudian dilanjutkan dengan yang kedua dengan primer HBS1 dan HBS2.⁹ Primer yang digunakan untuk deteksi perpindahan gen polimerase yaitu P1 dan P8 yang menghasilkan sekitar 342 pasang basa (pb) (Tabel 1).

Campuran induk reaksi amplifikasi adalah sebagai berikut: 10× *high fidelity PCR buffer* 5 µL, 10 mM

Tabel 1. Sekuens primer, jumlah hasil dan posisi penempelan nukleotida.⁹

Nama primer	Sekuens	Posisi
Primer P7 & P8 hasil 541pb		
P7: forward	5'GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC3'	256-278
P8: reverse	5'CGG TA(A/T) AAA GGG ACT CA(A/C) GAT3'	796-776
Primer HBS1 & HBS2 hasil 259 pb		
HBS1 (P1): forward	5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3'	455-474
HBS2 (P2): reverse	5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3'	713-694
Primer P1 & P8 hasil 342 pb		
P1: forward	5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3'	455-474
P8: reverse	5'CGG TA(A/T) AAA GGG ACT CA(A/C) GAT3'	796-776

dNTP mix 1 μ L, 50 mM $MgSO_4$ 2 μ L, primer forward 1 μ L (50 pmol/ μ L), primer reverse 1 μ L (50 pmol/ μ L), cetakan cDNA 10 μ L, platinum tag high fidelity 0,2 μ L, dan air suling sampai jumlah keseluruhan volume 50 μ L. Kondisi PCR adalah 94°C selama lima (5) menit untuk predenaturasi, denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, annealing pada suhu 50°C selama satu menit dan perpanjangan waktu pada suhu 72°C selama satu menit, sebanyak 40 siklus. Perpanjangan waktu akhir pada 72°C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis di gel agarose 2% yang mengandung ethidium bromide. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama kurang lebih antara 20-30 menit. Selanjutnya untuk penggambaran pita DNA dideteksi dengan UV-transluminator.

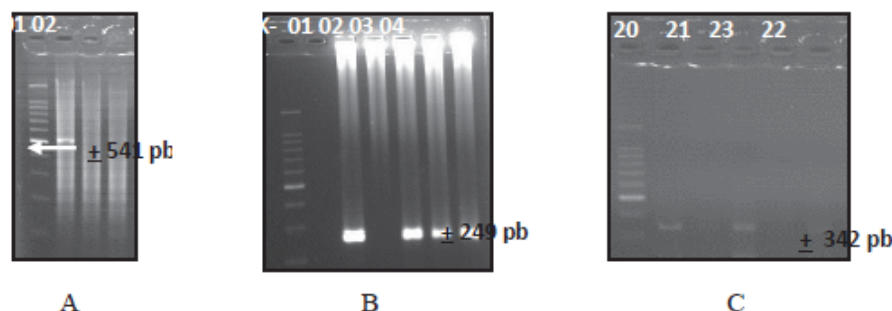
Hasil PCR yang positif ditandai dengan pembentukan pita DNA yang berukuran 342 pb di gel agarose 2%. Hasil ini kemudian digunakan cetakan untuk sekuensing. Reagen yang digunakan yaitu the Big Dye Deoxy Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sekuensing menggunakan ABI Prism 310 Genetic analyzer (Perkin Elmer). Analisis gen polimerase VHB dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit dan Clone Manager.

HASIL DAN PEMBAHASAN

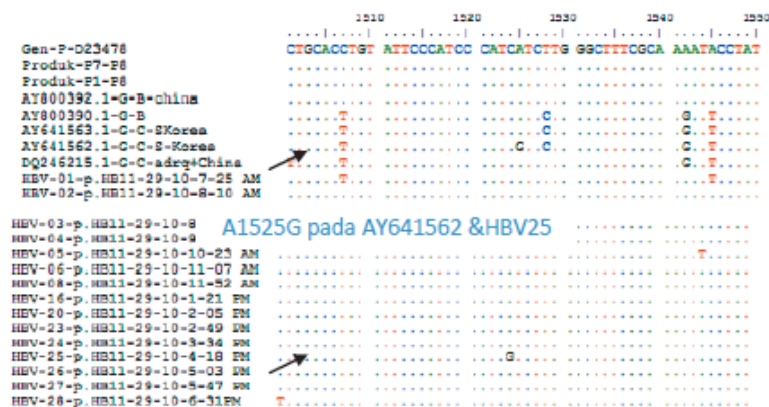
Penelitian ini menggunakan 20 serum yang terdiri dari 10 bahan dari pasien infeksi VHB yang tidak mendapatkan pengobatan anti virus digunakan sebagai pembandingan dan 10 dari yang mendapat pengobatan *telbivudin* selama satu (1) tahun. Sampel dari kelompok pembandingan yang dapat dianalisis sebanyak delapan (8) sampel, yaitu Hepatiti B Virus dari 01 (HBV01), HBV02, HBV03, HBV04, HBV05, HBV06, HBV08 dan HBV16. Sampel dari serum pasien infeksi VHB yang mendapat pengobatan *telbivudin* sebanyak tujuh (7) sampel yaitu HBV20, HBV23, HBV24, HBV25, HBV26, HBV27 dan HBV28.

Penyarian DNA dilakukan dari serum pasien infeksi VHB. Hasil menyarikan DNA digunakan sebagai cetakan pembentuk untuk amplifikasi dengan PCR. Primer yang digunakan yaitu P7 dan P8 menghasilkan 541bp, sedangkan P1 dan P2 menghasilkan 259bp. Primer yang digunakan untuk mendeteksi perpindahan gen polimerase yaitu P1 dan P8 menghasilkan 342bp (Gambar 1).

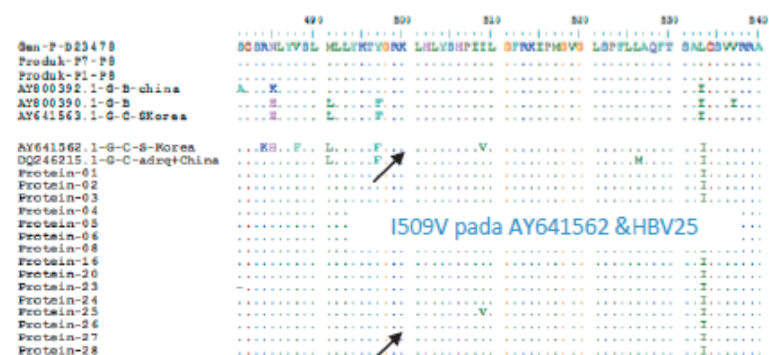
Hasil PCR kemudian disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida gen polimerase VHB. Analisis nukleotida dari sampel penelitian ini dibandingkan dengan sekuens gen polimerase VHB yang terdapat di *genebank*. Sekuens dari *genebank*



Gambar 1. Hasil elektroforesis dari PCR dengan primer P7-P8 (A), P1-P2 (B) dan P1-P8 (C) dari serum pasien infeksi VHB. M = Petanda, K = Pembandingan negatif.



Gambar 2. Ragaman genetik gen polimerase virus hepatitis B di pasien terkait yang kronis dan mendapat pengobatan telbivudin, yaitu nukleotida A1525G di sampel HBV25.



Gambar 3. Ragaman genetik gen polimerase virus hepatitis B di nukleotida A1525G sampel HBV25 yang menyebabkan perubahan asam amino I509V seperti di sekuens dengan nomor jangkauan AY641562.

yang digunakan yaitu yang dengan nomor jangkauan AY800392, AY800390, AY641563, AY641562 dan DQ246215. Hasil analisis nukleotida pada penelitian ini menunjukkan bahwa ragaman genetik gen polimerase virus hepatitis B pasien hepatitis B kronis yang mendapat pengobatan *telbivudin* yaitu nukleotida A1525G di sampel HBV25 (lihat Gambar 2) yang menyebabkan perubahan asam amino I509V (lihat Gambar 3), seperti sekuens dengan nomor jangkauan AY641562. Ragaman genetik juga ditemukan di nukleotida A1554G sampel HBV20 dan HBV25, serta nukleotida T1593C dan C1629T sampel HBV25 (lihat Gambar 4) yang tidak menunjukkan perubahan asam amino.

Perpindahan nukleotida G1650T yang menyebabkan perubahan asam amino M550I ditunjukkan di sekuens dengan nomor jangkauan DQ 246215 (lihat Gambar 5).

Ragaman genetik dan perpindahan genom VHB pasien hepatitis B kronis penting untuk digunakan sebagai dasar dalam memberikan pengobatan yang tepat baginya. Perpindahan genom VHB yang berhubungan dengan resistansi obat antivirus dapat menyebabkan pengobatannya mengalami kegagalan. Kondisi ini justru akan menyebabkan virus menjadi aktif kembali, sehingga meningkatkan *viral load* yang merupakan tanda peningkatan jumlahnya di serum pasien. Hal ini merupakan kondisi yang merugikan dan memperparah pasien, sehingga analisis genom VHB mereka yang terkait hepatitis kronis yang mendapat pengobatan antivirus penting untuk dilakukan. Apabila memang terdapat perpindahan genom VHB, maka pasien dapat dipilihkan gabungan pengobatan yang tepat sesuai dengan ragaman genetik genom VHB di masing-masing yang bersangkutan.



Gambar 4. Ragaman genetik gen polimerase virus hepatitis B pasien yang kronis yang mendapat pengobatan telbivudin, yaitu sampel HBV20 di nukleotida A1554G, dan HBV25 di nukleotida T1593C serta C1629T dan perpindahan nukleotida G1650T yang menyebabkan perubahan asam amino M550I di sekuens dengan nomor jangkauan DQ 246215.



Gambar 5. Perpindahan nukleotida G1650T yang menyebabkan perubahan asam amino M550I di sekuens dengan nomor jangkauan DQ 246215.

Berbagai macam obat antivirus termasuk golongan nukleosida yang berfungsi sebagai penghalang polimerase (*reverse transcriptase*) untuk menghambat fungsi polimerase VHB. Obat tersebut dibagi menjadi tiga golongan yaitu: L-Nukleosida sejalan, yaitu lamivudin, derivat 5-fluoro emtricitabin, telbivudin (*L*-thymidin), torcitabin (*L*-deoxycytidin) dan clevudin (*L*-FMAU); Acyclic nucleoside phosphonates, diwakili

oleh dAMP sejalan yaitu adefovir dan tenofovir; Deoxyguanosine sejalan yang bagian deoxyribosa digantikan dengan derivat cyclopentane yaitu entecavir dan abacavir.⁶

Antivirus yang digunakan untuk pengobatan saat ini yaitu interferon alfa-2b (*Intron A*, Schering), lamivudin (*Epivir*, GlaxoSmithKline), adefovir, entecavir (*Baraclude*, BristolMyers Squibb), pegylated interferon

alfa-2a (PEG-IFN; Pegasys, Roche) dan telbivudin (Tyzeka, Idenix/Novartis).¹ Pemberian pengobatan antivirus ini dapat menyebabkan resistansi virus. Resistansi VHB terhadap antiviral dapat diberi batasan di tingkat yang berbeda, yang biasanya berkembang secara berurutan, yaitu: Resistansi genotipe, yaitu deteksi perpindahan gen polimerase yang diketahui memberikan hal tersebut terhadap obat; Peningkatan virus yaitu paling sedikit satu log 10 kopi/mL dibandingkan dengan nilai terendah selama pengobatan, terkait dengan keberadaan perpindahan resistansi beserta yang terkait genotipe; Kegagalan klinis diberi batasan sebagai peningkatan jumlah virus dan kadar ALT yang kemudian disertai dengan perkembangan penyakit hati mengikuti yang berhubungan dengan jumlah virus.⁵

Telbivudin merupakan L-nukleosida yang sejalan sama seperti lamivudin dan juga mempunyai persamaan profil resistansi dengan lamivudin. Profil resistansi terhadap lamivudin terutama bertempat di domain C reverse transcriptase berbentuk tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) yaitu M204V atau M204I (sebelumnya disebut M550V atau M550I). Dan terjadi pengganti valin atau isoleusin menggantikan metionin di asam amino posisi 550 dari protein polimerase VHB.^{5,10} Profil resistansi telbivudin sering dihubungkan dengan perpindahan tyrosine-isoleusine-aspartat-aspartat (YIDD) yaitu M550I di asam amino posisi 550 dari protein polimerase VHB, bukan M250V,5 sehingga pada penelitian ini digunakan primer P1 dan P8 yang meliputi nukleotida di posisi perpindahan tersebut (lihat Gambar 1).

Hasil meneliti ini menunjukkan ragam genetik gen polimerase VHB ditemukan di HBV20 yaitu: A1554G dan HBV25 adalah A1554G, T1593C, serta C1629T. Keempat ragam genetik ini tidak menyebabkan perubahan asam amino. Ragaman genetik yang menyebabkan perubahan asam amino ditemukan di HBV25 yaitu nukleotida A1525G yang menyebabkan perubahan asam amino I509V seperti di sekuens dengan nomor jangkauan AY641562 (lihat Gambar 2,3). Sampel yang digunakan untuk nomor jangkauan AY641562 adalah VHB isolat He82 yang berasal dari pasien karsinoma hepatoseluler.¹¹

Ragaman genetik yang ditemukan dari telitian ini memang berbeda dengan kajian yang lain. Resistansi telbivudin pada umumnya dihubungkan dengan bentuk YIDD, yaitu M204I yang terjadi di sekitar 5% pasien setelah satu (1) tahun pengobatan telbivudin dan dihubungkan dengan perpindahan M204I, sedangkan yang di L180M atau V173L yang sering ditemukan pada pengobatan lamivudin dan tidak terdeteksi pada yang telbivudin.^{5,12} Pengobatan lamivudin jangka panjang terbatas karena kemunculan mutan YMDD (24% pada tahun pertama dan meningkat menjadi 70%

pada yang keempat. Setelah satu tahun pengobatan, mutan resisten terhadap lamivudin muncul di 22% jumlah pasien, meningkat menjadi 38% setelah dua (2) tahun, 53% , setelah tiga (3) tahun, 66% setelah empat tahun, dan 69% setelah lima (5) tahun. Namun, ini juga berarti bahwa sekitar 30% jumlah pasien, tampak tidak pernah mengembangkan resistansi terhadap lamivudin. Hal ini yang menguntungkan dan secara farmakokinetik juga menunjukkan tidak ada gangguan dalam fungsi hati.⁵ Setelah mutan YMDD muncul, DNA HBV serum tampil kembali, ALT dapat meningkat dan terjadi kegagalan pengobatan. American Association baru-baru ini diperbarui menjadi Studi Penyakit Hati yang berpedoman tidak menyarankan lamivudin sebagai pilihan pengobatan lini pertama, karena kekhawatiran dapat resistansi virus.⁴

Telbivudin secara struktural mirip lamivudin dan telah disetujui oleh FDA Amerika untuk pengobatan infeksi hepatitis B kronis. Hasil meneliti GLOBE dalam uji tahap ketiga (III) telbivudin menunjukkan bahwa resistansi VHB setelah 52 minggu pengobatan terjadi 3% jumlah pasien dengan HBeAg positif dan 2% yang dengan HBeAg negatif. Resistansi setelah 104 minggu pengobatan terjadi peningkatan yaitu 17,8–21,6% jumlah pasien dengan HBeAg positif dan 7,3–8,6% yang dengan HBeAg negatif. Peningkatan ini berkaitan dengan resistansi VHB karena perpindahan.⁷

Uji klinis tahap ketiga (III) GLOBE untuk membandingkan pengobatan telbivudin dengan 680 jumlah sampel dan lamivudin 687 buah. Penelitian di pasien dengan HBeAg positif menunjukkan bahwa respons pengobatan telbivudin setelah 52 minggu adalah 75% dan lamivudin 67%^{7,8}, DNA VHB tidak terdeteksi 60% sampel telbivudin dan 40% pada pengobatan lamivudin, kadar ALT normal di 77% sampel telbivudin dan 75% yang terkait lamivudin dan terjadi serokonversi HBeAg pada 22% pengobatan telbivudin dan 21% yang terkait lamivudin. Setelah pengobatan selama 104 minggu yang bersangkutan menunjukkan respons terkait sebanyak 64% untuk telbivudin dan 48% yang terkait lamivudin, DNA VHB tidak terdeteksi di 56% sampel telbivudin dan 39% yang terkait lamivudin, kadar ALT normal di 70% sampel telbivudin dan 62% yang terkait lamivudin dan terjadi serokonversi HBeAg 29% di telbivudin dan 24% yang terkait lamivudin.⁷

Penelitian di pasien dengan HBeAg negatif menunjukkan bahwa setelah pengobatan selama 52 minggu menunjukkan respons pengobatan telbivudin 75% dan lamivudin 77%, DNA VHB tidak terdeteksi di 88% sampel telbivudin dan 71% yang terkait lamivudin dan kadar ALT normal di 74% sampel telbivudin dan 79% yang terkait lamivudin. Setelah pengobatan selama 104 minggu menunjukkan respons pengobatan 78% di telbivudin dan 66% yang terkait

lamivudin, DNA VHB tidak terdeteksi di 82% sampel *telbivudin* dan 57% yang terkait *lamivudin* dan kadar ALT normal di 78% sampel *telbivudin* serta 70% yang terkait *lamivudin*.⁷

Resistensi genotipe setelah pengobatan satu tahun adalah 4,4% di pasien HBeAg positif dan 2,7% yang negatif. Setelah dua tahun pengobatan, 21,6% dari pasien HBeAg positif dan 8,6% yang negatif. Meskipun angka resistansi ini lebih tinggi daripada nukleosida yang sejalan lainnya kecuali *lamivudin*, tetapi *telbivudin* memberikan respons yang cepat untuk menurunkan jumlah virus dalam waktu 24 minggu.¹

Profil perpindahan YMDD yaitu perubahan nukleotida G1650T yang menyebabkan asam amino M550I beralih bentuk terdapat di sekuens dengan nomor jangkauan DQ 246215. Sampel tersebut merupakan VHB isolat GZ-DYH, *complete genome*, dari Tiongkok, sub tipe adr-q+, genotipe C.

SIMPULAN

Di dasari telitian ini dapat disimpulkan, bahwa terdapat ragam genetik di gen polimerase VHB terkait HBV20, yaitu A1554G dan HBV25 terkait A1554G, T1593C, serta C1629T yang tidak menyebabkan perubahan asam amino. Ragam genetik juga ditemukan di gen polimerase HBV pasien infeksi hepatitis B kronis HBV25 yang mendapat pengobatan *telbivudin* yaitu nukleotida A1525G di HBV25 yang menyebabkan perubahan asam amino I509V sama seperti dengan sekuens nomor jangkauan AY641562. Perpindahan gen polimerase VHB pasien hepatitis B kronis yang mendapat pengobatan *telbivudin* di Surabaya terjadi di A1525G.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para peneliti menyampaikan ucapan terima kasih kepada Pemerintah Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini lewat Dana DP2M Tahun

2009. Demikian juga kepada Lembaga Penyakit Tropis serta Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Airlangga yang telah membantu sarana dan prasarana pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tran TT. Clinical update: hepatitis B. *Gastroenterology & hepatology*. 2007; 3 (7): 538–45.
2. Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*. 2009; 286 (1): 52–9.
3. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology*. 2009; 50 (3): 661–2.
4. Bisceglie AM Di. NIH Public Access. *Hepatology*. 2009;49 (5 Suppl): S56–S60. doi:10.1002/hep.22962.Hepatitis.
5. Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2007; 13 (1): 125–40.
6. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *Journal of hepatology*. 2006; 44 (3): 593–606.
7. Matthews SJ. Telbivudine for the management of chronic hepatitis B virus infection. *Clinical therapeutics*. 2007; 29 (12): 2635–53.
8. Lai C, Gane E, Liaw Y, Hsu CW, Thongsawat S, Wang Y, Chen Y, Heathcote EJ, Rasenack J, Bzowej N, Nacumov NV, Di Bisceglie AM, Zeuzem S, Moon YM, Goodman Z, Chao G, Constance BF, Brown NA. Telbivudine versus Lamivudine in Patients with Chronic Hepatitis B. *The new england journal of medicine* original. 2007; 357 (25): 2576–88.
9. Lusida MI, Nugrahaputra VE, Handayani R, Soetjipto, Nagano-Fujii M, Sasayama M, Utsumi T, Hotta H. Novel Subgenotypes of Hepatitis B Virus Genotypes C and D in. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46 (7): 2160–2166.
10. Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Lewin SR, Fyfe J, Locarnini SA, Manns M, Trautwein C, Bock TC. Restoration of Replication Phenotype of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Mutants by Compensatory Changes in the "Fingers" Subdomain of the Viral Polymerase Selected as a Consequence of Mutations in the Overlapping S Gene. *Virology*. 2002; 299 (1): 88–99.
11. Song B, Kim H, Kim S, Cha C, Kook Y, Kim B. Comparison of Full Length Sequences of Hepatitis B Virus Isolates in Hepatocellular Carcinoma Patients and Asymptomatic Carriers of Korea. *Journal of Medical Virology*. 2005; 75: 13–19.
12. Lai C-L, Leung N, Teo E-K, Tong M, Wong F, Hann WH, Han S, poymard T, Myers M, Chao G, Lloyd D, Brown NA. A 1-Year Trial of Telbivudine, Lamivudine, and the Combination in Patients With Hepatitis B e Antigen-Positive Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. 2005; 129 (2): 528–536.